

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/82, C07K 14/415, C12N 5/10, A01H 5/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/09719 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. Februar 2000 (24.02.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05890 (22) Internationales Anmeldedatum: 11. August 1999 (11.08.99) (30) Prioritätsdaten: 198 36 405.9 12. August 1998 (12.08.98) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: RAUSCH, Thomas [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 360, D-69120 Heidelberg (DE). (74) Anwälte: SCHRELL, Andreas usw.; Gleiss & Große, May- bachstrasse 6A, D-70469 Stuttgart (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, MD, MX, PL, RO, RU, SK, TR, UA, US, ZA, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>	
(54) Title: TRANSGENIC PLANTS AND PLANT CELLS COMPRISING A REDUCED EXPRESSION OF INVERTASE INHIBITORS (54) Bezeichnung: TRANSGENE PFLANZEN UND PFLANZENZELLEN MIT VERMINDERTER EXPRESSION VON INVERTASEINHIBITOREN (57) Abstract <p>The invention relates to transgenic plants and plant cells comprising a reduced expression of invertase inhibitors. The modification of the expression of the invertase inhibitors is achieved by introducing a cDNA sequence in an antisense orientation with respect to a promoter. The expression of the antisense DNA sequence results either by regulating the CaMV35S promoter or tissue-specific promoters.</p> (57) Zusammenfassung <p>Es werden transgene Pflanzenzellen und Pflanzen mit reduzierter Expression von Invertaseinhibitoren beschrieben. Die Veränderung der Expression der Invertaseinhibitoren wird durch Einführung einer cDNA-Sequenz in antisense-Orientierung zu einem Promotor erreicht. Die Expression der antisense-DNA-Sequenz erfolgt entweder unter der Regulation des CaMV35S-Promotors oder gewebespezifischer Promotoren.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Transgene Pflanzen und Pflanzenzellen mit vermin-
derter Expression von Invertaseinhibitoren

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft transgene Pflanzenzellen und Pflanzen, Verfahren für deren Bereitstellung sowie die Verwendung von Invertaseinhibitor-cDNA-Sequenzen in antisense- oder sense-Orientierung zur Herstellung solcher Pflanzen.

Die Verbesserung von Qualität und/oder Quantität pflanzlicher Reservestoffe in Samen dicotyler und monocotyler landwirtschaftlicher Nutzpflanzen stellt ein wichtiges Ziel biotechnologischer Forschung dar. In der Regel wurden bisher Strategien entwickelt, die auf der Einführung bestimmter Gene basieren, deren Genprodukte Enzyme darstellen, die an der Synthese des Reservestoffes selbst (z.B. ADP-Glucosepyrophosphorylase) beteiligt sind. Desweiteren wurden aber auch Verfahren beschreiben, in denen durch veränderte Expression von heterologen und damit deregulierten Invertasen bzw. Glucokinasen im Cytosol eine erhöhte Glycolyserate erreicht wird (DE-A1-195 29 696). In letzterer Variante führt die erhöhte Spaltung von Saccharose durch eine deregulierte pilzliche Invertase in Kombination mit einer deregulierten bakteriellen Glucokinase zu einer verstärkten Glycolyserate. Dieser Ansatz beruht auf der Annahme, daß auf Grund der erhöhten

Konzentrationen an Intermediaten der Glycolyse die Synthese von Speicherölen in Samen stimuliert wird, da die Metabolisierung des primären Photoassimilats Saccharose zu phosphorylierten Hexosen bzw. den Fettsäurevorstufen Pyruvat und Acetyl-CoA gefördert wird.

Die DE-A1-195 29 696 beschreibt demgemäß die Einführung eines artfremden, z.B. pilzlichen Gens zur Expression der Invertase. Dieses pilzliche Invertase-Enzym, das artfremd ist und deshalb keiner Regulation unterliegt, wird aufgrund der Zuführung des fremden Gens unter der Regulation eines geeigneten Promotors verstärkt gebildet, wodurch der von der Invertase katalysierte Abbau der Saccharose in Glucose und Fructose beschleunigt erfolgt. Die mit höherer Geschwindigkeit erfolgende Bildung der Glucose soll letztendlich eine beschleunigte Produktion von pflanzlichen Speicherstoffen bewirken. Dieses Verfahren beruht auf einem Eingriff in den Metabolismus in der Zelle des Samenspeichergewebes, wobei der Assimilattransfer zwischen maternalen und Samenparenchym nur indirekt beeinflußt wird.

Die Bedeutung von Zellwand-Invertasen für die Entwicklung stärke- und proteinreicher Samen ist bekannt. So wird z.B. die Stärkeakkumulation in Mais-samen bei verminderter Expression einer Zellwand-Invertase durch Störung des Assimilattransfers zwischen Pedicel und Endosperm gestört. Für verschiedene Pflanzenspezies sind blütenspezifische Zellwand-Invertase-Isoformen bekannt. Für *Nicotiana tabacum* konnte gezeigt werden, daß ein apoplastischer Invertaseinhibitor besonders im Ovar und den Staub-

blättern stark exprimiert wird. Greiner et al. (Plant Physiol. (1998), 733-742) offenbart die Aminosäure- und cDNA-Sequenz des genannten Invertaseinhibitors sowie dessen in vitro-Funktionsnachweis mittels heterolog exprimiertem Inhibitorprotein. Hingegen wurde eine in vivo-Hemmung noch nicht gezeigt. Bekannt ist es überdies, daß in verschiedenen Geweben und zu verschiedenen Zeitpunkten der pflanzlichen Entwicklung unterschiedliche Isoformen von Zellwandinvertasen und Invertaseinhibitoren vorliegen.

Eine gezielte Zuordnung der Aktivitäten und deren möglichen Zusammenwirken dieser zeit- und gewebe-spezifisch auftretenden beiden Proteine ist bisher nicht möglich. Untersuchungen zur in-vivo-Situation hinsichtlich der Regulation von Zellwand-Invertasen durch Invertaseinhibitoren sind nicht bekannt. Ebenso wenig war bekannt, ob und wenn ja welche Isoformen der Zellwandinvertasen während der Samenentwicklung einer endogenen Regulation durch Invertaseinhibitoren unterliegen und wenn ja, welche Isoformen der Invertaseinhibitoren. Die gezielte Nutzung dieser Proteine für die Herstellung vorteilhafter Pflanzen ist daher bisher nicht möglich.

Der Erfindung liegt daher das technische Problem zugrunde, transgene Pflanzenzellen, Pflanzen und diese herstellende Verfahren bereitzustellen, wobei die Pflanzen sich durch die Bildung von Samen auszeichnen, die gegenüber Samen von nicht transformierten Pflanzen eine größere Menge pflanzlicher Speicherstoffe wie Kohlenhydrate, Fette oder Proteine aufweisen, ohne daß dabei endogene oder exo-

gene Proteine überexprimiert werden und der Phänotyp der Pflanze sowie deren Entwicklung beeinträchtigt werden.

Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende technische Problem wird durch ein Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze mit einer deregulierten und die Samenentwicklung fördernden Invertaseaktivität bereitgestellt, wobei das Verfahren vorsieht, aus einer cDNA-Bank einer Zellsuspensionskultur oder von Blüten mit jungen Samenanlagen aus einer Pflanze eine Nukleotidsequenz eines Invertaseinhibitors zu gewinnen oder davon abzuleiten, eine Pflanzenzelle einer Pflanze derselben Art oder Sorte mit einem DNA-Konstrukt, enthaltend die funktionell mit mindestens einer regulatorischen Einheit verbundene Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors zu transformieren, zu kultivieren und zu einer Pflanze zu regenerieren, deren Samen im Vergleich zu nicht mit einem solchen DNA-Konstrukt transformierten Pflanzen eine größere Menge an Speicherstoffen wie Kohlenhydrat, Fett oder Protein bildet.

Die Erfindung sieht insbesondere vor, transgene Pflanzen mit einer veränderten Expression eines, vorzugsweise apoplastischen, Invertaseinhibitors herzustellen, wobei sich die Pflanzen dadurch auszeichnen, das die Expression von Invertaseinhibitorproteinen während der Samenentwicklung reduziert oder ganz eliminiert ist. Das Verfahren läßt sich vorteilhafter Weise auf die unterschiedlichsten dicotylen oder monocotylen Nutzpflanzen anwenden z.B. Raps, Sonnenblumen, Erdnuß, Ölpalme, Sojabohne, Ca-

lendula officinalis, *Coriandrum sativum*, *Crambe abyssinica*, *Cuphea* ssp., *Dimorphotheca pluvialis*, *Euphorbia lagascae*, *Euphorbia lathyris*, *Lesquerella grandiflora*, *Limnanthes alba*, *Linum usitatissimum*, *Lunaria annua*, *Lunaria biennis*, *Oenothera* ssp., *Ricinus communis*, *Simmondsia chinensis* als Pflanzen mit Fett speichernden Samen; Mais, Reis, Weizen, Gerste, Hafer, Roggen als Pflanzen mit Stärke speichernden Samen; und beispielsweise Sojabohne oder Erbse als Pflanzen mit Protein speichernden Samen.

Die Erfindung sieht also vor, eine Pflanzenzelle mit einer unter Kontrolle mindestens einer regulatorischen Einheit stehenden Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitorgens zu transformieren, wobei die Nucleotidsequenz des Invertaseinhibitorgens zur Elimination oder Reduzierung der Aktivität eines zelleigenen, endogenen Invertaseinhibitors befähigt ist. In bevorzugter Ausführungsform kann die Elimination der Aktivität eines endogenen Invertaseinhibitors in der Zelle dadurch erreicht werden, daß die Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors in einem antisense-DNA-Konstrukt eingesetzt wird, d.h. ein Konstrukt, in dem eine Nucleotidsequenz des Invertaseinhibitorgens in antisense-Orientierung zu einem Promotor vorhanden ist. Durch die Expression, d.h. im vorliegenden Kontext die Transcription des antisense-Konstrukts wird die Aktivität des zelleigenen Invertaseinhibitorgens gehemmt oder reduziert, so daß die so deregulierte Invertase zu einer erhöhten Speicherstoffakkumulation im Samen führt.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem antisense-Konstrukt ein DNA-Konstrukt verstanden, welches eine in antisense-Orientierung zu einem Promotor funktionell verbundene Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors aufweist, wobei diese Nucleotidsequenz entweder die full-length-cDNA des Invertaseinhibitors, eine davon abgeleitete Sequenz oder ein Fragment, allelische Variante oder Derivat davon ist.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer von einer cDNA abgeleiteten Sequenz eine mit dieser cDNA-Sequenz hybridisierende künstliche oder natürliche Nucleotidsequenz verstanden, also eine Nucleotidsequenz, die unter den in Sambrook et al. (Molecular Cloning, a laboratory manual, 2nd edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press) beschriebenen Bedingungen mit der cDNA-Sequenz des Invertaseinhibitors hybridisiert, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen. Erfindungsgemäß weisen hybridisierende Sequenzen eine Sequenzidentität von 60, 70, 80, 90, 95 oder 97% besonders bevorzugt 99%, zu der cDNA-Sequenz eines Invertaseinhibitors auf. Sofern erfindungsgemäß Fragmente einer cDNA-Sequenz eines Invertaseinhibitors verwendet werden, weisen die Fragmente zumindest eine Länge und Sequenzähnlichkeit auf, die ausreicht, durch Hybridisierung zu Wildtyp-Transcript die Translation einer endogen gebildeten Invertaseinhibitor mRNA zu inhibieren, beispielsweise eine Länge von wenigen hundert Basenpaaren. Selbstverständlich kann auch vorgesehen sein, daß die antisense-Konstrukte Nucleotidsequenzen eines Invertaseinhibitors aufweisen oder aus diesen

bestehen, die transkribiert, aber nicht translatiert sind, d.h. nicht translatierte Regionen, sogenannte UTR's.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sind unter DNA-Konstrukten, die die Elimination oder Reduktion der Aktivität eines endogenen Invertaseinhibitorgens bewirken können, auch DNA-Konstrukte zu verstehen, die eine wie vorstehend definierte Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors oder eine davon abgeleitete Sequenz aufweisen, die funktionell in sense-Orientierung mit mindestens einer regulatorischen Einheit, z.B. einem Promotor, verbunden sind. Mit derartigen Konstrukten kann durch Cosuppression die Bildung endogener Invertaseinhibitoren verhindert werden, z.B. dadurch, daß eine Vielzahl von sense-Kopien der Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors in dem Genom der transformierten Zelle vorhanden sind und die Expression endogener Invertaseinhibitoren eliminieren.

Die erfindungsgemäßen Konstrukte sind vorzugsweise in einem Vektor angeordnet, z.B. einem Plasmid, Virus, Cosmid, Bakteriophagen oder einem sonstigen in der Gentechnik üblichen Vektor.

Erfindungsgemäß kann vorgesehen sein, die einzusetzende Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors nicht nur funktionell mit einem 5'-wärts gelegenen Promotor zu verbinden, sondern vorteilhafter auch 3'-wärts der Nucleotidsequenz ein Transcriptionsterminationssignal, z.B. aus dem NOS-Gen von *Agrobacterium tumefaciens*, einzusetzen. Selbstverständlich ist es auch möglich, in dem Vektor weite-

re funktionelle Einheiten vorzusehen, wie T-DNA border-Sequenzen oder die Vektoren stabilisierende Elemente.

Die Erfindung stellt in bevorzugterweise also Pflanzen bereit, die in ihren Samen eine im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzen erhöhte Speicherstoffmenge aufweisen, wobei eine im Vergleich erhöhte Speicherstoffmenge bedeutet, daß die durchschnittliche Menge des untersuchten Speicherstoffs in Samen einer Gesamtheit von transformierten Pflanzen um vorzugsweise 5, bevorzugt 10, 20, 30 40, 50 besonders bevorzugt 90, 100, 200 oder 300% höher ist als die durchschnittliche Menge des in Frage stehenden Speicherstoffes im Samen von einer Gesamtheit nicht transformierter Pflanzen.

Die Erfindung betrifft daher die überraschende Lehre, daß mittels einer Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitorgens, insbesondere einer cDNA eines Invertaseinhibitorgens, Pflanzen hergestellt werden können, die in-vivo eine erhöhte Speicherstoffakkumulation im Samen aufweisen, ohne daß die Entwicklung der Pflanze in anderer Hinsicht verändert oder beeinträchtigt wird. Die Erfindung beruht dabei unter anderem auf der überraschenden Tatsache, daß die endogenen Invertasen bei der Samenentwicklung einer endogenen Regulation durch Invertaseinhibitoren unterliegen.

Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung einer funktionell mit mindestens einer regulatorischen Einheit verbundenen Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitorgens zur Transformation und Her-

stellung von Pflanzen, die eine modifizierte Samenentwicklung aufweisen, insbesondere Samen bilden, die eine erhöhte Speicherstoffmenge gegenüber Samen nicht transformierter Pflanzen aufweisen.

Die Erfindung betrifft insbesondere die vorgenannte Verwendung einer Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitorgens, wobei diese aus einer cDNA-Bank einer Zellsuspensionskultur oder aus Blüten mit jungen Samenanlagen der Pflanzenart oder gegebenenfalls -sorte gewonnen oder davon abgeleitet wurde, die erfindungsgemäß mit dem mittels dieser Nucleotidsequenz hergestellten DNA-Konstrukt der vorliegenden Erfindung zu transformieren ist. Die für die Transformation eingesetzte Nucleotidsequenz ist also die Nucleotidsequenz oder ist davon abgeleitet, die in der Zellsuspensionskultur oder in den Blüten mit jungen Samenanlagen vorherrschende Isoform des Invertaseinhibitors codiert.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sind Blüten mit jungen Samenanlagen Blüten mit unreifen Samenanlagen, das heißt nach Bestäubung aber vor Beginn der Dormanz.

Die Lösung des technischen Problems ist erfindungsgemäß auch eine transgene Pflanzenzelle, bei der im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzenzellen aufgrund verminderter Expression von Invertaseinhibitoren eine erhöhte Aktivität der Zellwand-Invertase vorliegt, wobei diese verminderte Expression durch Einführung einer der gleichen Pflanzenarten entsprechenden (homologen) und unter Regula-

tion eines Promotors stehenden Invertaseinhibitor-cDNA in antisense-Orientierung ausgelöst wird. Erfindungsgemäß wird auch ein Verfahren zur Gewinnung von Invertaseinhibitor-cDNA-Sequenzen in sense- oder antisense-Orientierung bereitgestellt, wobei dieses - unabhängig von der jeweiligen Spezies - folgende Schritte enthält:

- a) Gewinnung einer Inhibitorproteinfraktion aus der Zellwandprotein-Fraktion einer entsprechenden Zellsuspensionskultur
- b) Gewinnung von entsprechenden Peptidsequenzen nach Spaltung und Reinigung der entstandenen Peptide
- c) Clonierung von zunächst partieller und in der Folge Vollängen-cDNA für das Invertaseinhibitorprotein aus einer cDNA-Bank
- d) Clonierung der Invertaseinhibitor-cDNA in sense oder antisense-Orientierung in einen Vektor, z.B. einen binären Vektor
- e) Transformation der Pflanzenspezies mit dem sense- oder antisense-Genkonstrukt.

Der Assimilattransfer zwischen maternalem Gewebe und Samengewebe ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Bildung der pflanzlichen Speicherstoffe im Samen. Wird dieser Schritt durch die Erhöhung der Aktivität der in der Übergangszone exprimierten Zellwand-Invertase beschleunigt, so kommt es in Folge des verstärkten Assimilattrans-

fers (die erhöhte Aktivität der Zellwand-Invertase bewirkt eine Steigerung des Assimilattransfers zwischen maternalem und Samengewebe) zu einer erhöhten Akkumulation des Hauptspeicherstoffs der jeweiligen Pflanzenspezies (Stärke, Fett, Protein).

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung der vorgenannten Pflanzen, wobei in einem ersten Schritt aus einer Zellsuspensionskultur oder aus Blüten mit jungen Samenanlagen eine Inhibitorproteinfraction, insbesondere die vorherrschende Inhibitorproteinfraction, aus einer Zellwandproteinfraction gewonnen wird, anschließend in einem zweiten Schritt die Inhibitorproteinfraction gereinigt ggf. gespalten und zumindest N-terminal sequenziert wird, so daß aus der so gewonnenen Aminosäuresequenz eine Nucleotidsequenz abgeleitet werden kann, im Rahmen eines dritten Schritts mittels beispielsweise Primern, partielle oder full-length cDNA für das Invertaseinhibitorprotein aus einer cDNA-Bank einer Zellsuspensionskultur oder von Blüten mit jungen Samenanlagen der gleichen, vorgenannten Pflanze bzw. Sorte cloniert wird, anschließend in einem vierten Schritt die gewonnene cDNA in sense- oder antisense-Orientierung in einen Vektor cloniert wird, um anschließend in einem fünften Schritt eine Pflanzenzelle gleicher Art oder Sorte mit dem so gewonnenen DNA-Konstrukt zu transformieren, wobei dies die Art oder Sorte ist, aus der die cDNA, und die Aminosäuresequenz für die cDNA-Isolierung gewonnen wurde.

Die Erfindung betrifft daher auch gemäß des vorliegenden Verfahrens hergestellte Pflanzen, Pflanzen-

teile wie Wurzel, Stengel, Blätter, Ernte- und Vermehrungsmaterial wie Früchte, Pollen, Samen, Samenschale, Embryo, Sämlinge, Zellkulturen, Kalli etc. Die Erfindung betrifft dabei jegliche Pflanzensorte oder Pflanzenart und weist demgemäß keinerlei Sorten- oder Artspezifität auf. Das erfindungsgemäße Verfahren stellt ein im wesentlichen technisches Verfahren dar, wobei in dessen Rahmen eine gezielte Zuordnung vom Ausgangsmaterial für die zu verwendenden Mittel, wie cDNA-Sequenzen, zu zu transformierender, Pflanze d.h Zielobjekt, gegeben wird.

Im Gegensatz zu allen bisherigen Verfahren beruht daher die hier beschriebene Erfindung auf der Regulation spezifischer, während der Samenentwicklung exprimierter Zellwand-Invertase-Isoformen. Die Invertaseinhibitor-cDNA codiert in bevorzugter Ausführungsform eine apoplastische Variante des Invertaseinhibitors. Durch Einführung einer einzigen autologen, d.h. aus dem zu transformierenden Organismus stammenden bzw. davon abgeleiteten cDNA-Sequenz pflanzlichen Ursprungs wird der für den Assimilattransfer entscheidende Schritt der Saccharose-spaltung am natürlichen Wirkungsort beeinflusst. Die Beobachtung, daß die Einführung mindestens einer Sequenz, das heißt einer Invertaseinhibitor-cDNA, in sense- oder antisense-Orientierung unter der Steuerung z.B. des konstitutiven CaMV35S-Promotors, des Ubiquitin-Promotors oder Zein-Promotors aus Mais oder eines Promotors ähnlich hoher oder größerer Aktivität, z.B. auch eines gewebespezifischen Promotors, die gesamte vegetative Pflanzenentwicklung nicht beeinflusst, sondern nur während der Samenentwicklung zu einer spezifischen Deregulierung

führt, zeigt die extrem hohe Spezifität des transgenen Eingriffs. Die Vorteile dieser direkten Deregulierung sind offensichtlich: 1) es genügt ein einziges Genkonstrukt, um eine signifikante Veränderung der Reservestoffakkumulation zu erreichen, 2) es werden keine artfremden Genprodukte gebildet, 3) der Eingriff im Metabolismus ist hochgradig spezifisch, 4) für Tabak wird exemplarisch gezeigt, daß die veränderte Expression eines apoplastischen Invertaseinhibitors zu drastischen Änderungen der Speicherölbildung führt.

Die Beeinflussung, insbesondere Erhöhung der Akkumulation der Samenspeicherstoffe durch eine gezielte Veränderung der Expression des Invertaseinhibitors, insbesondere Verminderung, beruht unter anderem auf folgenden Mechanismen:

- a) Durch die Veränderung der Aktivitätsphase der Zellwand-Invertase im maternalen Gewebe wird die Effizienz der Nährstoffentladung beeinflusst, das heißt z.B. in Inhibitor-antisense-Transformanten, erhöht.
- b) Für die Synthese von Reserveölen des Samens ist der oxidative Pentosephosphatzyklus von entscheidender Bedeutung. Die anhaltend erhöhte Bereitstellung von Glucose in z.B. Inhibitor-antisense-Transformanten fördert daher die Speicherölsynthese.
- c) Durch die Veränderung des Verhältnisses von Hexosen zu Saccharose wird die Zellteilungsphase der Samenentwicklung beein-

flußt. Durch eine Verlängerung der Aktivitätsphase der Zellwand-Invertase in z.B. Inhibitor-antisense-Transformanten wird z.B. die Zellzahl pro Samen erhöht.

Im Vergleich zur ebenso möglichen Überexpression der am Assimilattransfer beteiligten Zellwand-Invertase(n) hat der hier beschriebene indirekte Ansatz einer Ausschaltung der Invertaseinhibitoren noch weitere Vorteile. Die im Verlauf der Samenbildung exprimierten Zellwand-Invertasen werden bereits natürlicherweise stark exprimiert, das Ausmaß einer zusätzlichen Induktion durch Einsatz starker Promotoren ist daher begrenzt, wohingegen durch die erfindungsgemäße antisense-Ausschaltung des Inhibitors eine starke Erhöhung der Zellwand-Invertase(n)-Aktivität erreicht werden kann. Zwar könnte durch Expression einer heterologen, deregulierten, inhibitorinsensitiven Invertase mit Signalpeptid für die Zielsteuerung in den Zellwandraum ein ähnlicher Effekt erreicht werden, doch müssen in diesem Fall artfremde Proteine eingesetzt werden. Außerdem besteht bei einer Kombination der für diesen Ansatz notwendigen samenspezifischen Promotoren mit einer deregulierten Invertase die große Gefahr, daß eine zu hohe Expression zu unerwünschten Nebenwirkungen führt. Im Gegensatz hierzu wird beim hier beschriebenen Verfahren die maximale Aktivität der natürlicherweise vorkommenden Zellwand-Invertasen nie überschritten, es wird lediglich die Zeitspanne ihrer Aktivität während der Reservestoffakkumulation ausgedehnt. Aus diesen Gründen ist die indirekte Regulation der Zellwand-Invertasen über antisense-Expression von Inverta-

seinhhibitoren oder im Rahmen der Cosuppressionstechnologie über sense-DNA-Konstrukte in jedem Falle der Einführung einer heterologen Invertase vorzuziehen und stellt eine bedeutsame technische Verbesserung dar.

Methoden zur Gewinnung einer homogenen Inhibitorproteinfraktion aus der apoplastischen Zellwandproteinfraktion einer Zellsuspensionskultur

Von der jeweiligen Pflanzenspezies wird eine Zellsuspensionskultur angelegt. Die Verfahren zur Gewinnung einer Zellkultur folgen Standardprotokollen der pflanzlichen Gewebekultur. In der Regel werden die Zellen unter sterilen Bedingungen in einem komplexen Nährmedium unter Zusatz von Saccharose (Kohlenstoffquelle) als Schüttelkultur angezogen. Unter diesen Anzuchtbedingungen exprimieren pflanzliche Zellen eine Zellwand-Invertase, die durch einen ebenfalls exprimierten Invertaseinhibitor reguliert wird.

Die Anreicherung und Reinigung des Invertaseinhibitors basiert auf dessen Bindung an die Zellwandinvertase. Zunächst wird eine Zellwandproteinfraktion durch Inkubation in 1 M NaCl, 1 mM PMSF bei 4°C unter Schütteln extrahiert. Hierbei werden in der Regel keine cytosolischen Proteine extrahiert. Die so gewonnene Zellwandproteinfraktion wird über Ammoniumsulfatfällung (80%) bzw. über Membranfiltration konzentriert. Durch anschließende Chromatographie an einer Concanavalin A-Säule wird eine Glycoproteinfraktion gewonnen, die die glycosylierte Zellwand-Invertase und den an diese gebundenen Inverta-

seinh inhibitor enthält. SDS-PAGE/Western blot-Analysen der so gewonnenen Zellwand-Invertase- und damit Invertaseinhibitor-angereicherten Fraktionen mit einem polyclonalen Antiserum gegen den Invertaseinhibitor aus Tabakzellen zeigen die Präsenz von Invertaseinhibitoren, in der Regel Protein von 15-25 kDa, an.

Die Figur 1 zeigt dazu den Nachweis von zum Tabak-Invertaseinhibitor homologen Invertaseinhibitoren anderer Pflanzenarten - eine Western Blot Analyse von aus Suspensionskulturen von *Chenopodium rubrum* (1) und *Daucus carota* (2) gewonnenen Zellwandprotein-Proben. Die Entwicklung wurde mit einem gegen den rekombinanten Tabak-Invertaseinhibitor gewonnenen Antiserum vorgenommen. Für beide Spezies wurden Invertaseinhibitor-Polypeptide von ca. 17 kDa detektiert.

Die weitere Reinigung der Komplexe aus Zellwand-Invertase und Invertaseinhibitor erfolgt über Ionenaustauscherchromatographie an einem Kationenaustauscher, z.B. Sulfopropylsephadex. Nach sequentieller Chromatographie, zunächst über einen pH-Gradienten (pH 8-12), danach über einen NaCl-Gradienten, wird eine stark angereicherte Präparation der Zellwand-Invertase gewonnen, wobei der Invertaseinhibitor im stabilen Komplex mit letzterer vorliegt. Die Peak-Fractionen der letzten Ionenaustauscherreinigung werden über SDS-PAGE/Western blot-Analyse auf Zellwand-Invertase hin detektiert, z.B. mit einem Antiserum gegen die Karotten-Zellwand-Invertasen. Außerdem werden die Invertase-Aktivitäten aller Fraktionen im gekoppelten enzyma-

tischen Test mit Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase ermittelt. Die Fraktionen mit starkem Zellwand-Invertase-Immunosignal aber geringer Invertaseaktivität enthalten das in der Regel hochreine Inhibitorprotein.

Methoden zur Gewinnung von Peptidsequenzen der gereinigten Invertaseinhibitoren

Das Inhibitorprotein liegt nach dem oben beschriebenen Reinigungsprotokoll ausreichend rein vor, um nach Elektrophoretik auf eine PMDF-Membran direkt N-terminal ansequenziert zu werden. Nach Gewinnung von 100-500 µg Inhibitorprotein kann dieses ggf. erneut über SDS-PAGE gereinigt und anschließend direkt im Gel tryptisch verdaut werden. Die Trennung der entstehenden Peptide über reverse phase-HPLC und deren anschließende Sequenzierung über Edmann-Abbau entspricht Standardverfahren. Die Kombination von N-terminaler Ansequenzierung und der Sequenzierung der beim tryptischen Verdau erhaltenen Peptide führt zu ausreichender Sequenzinformation für eine auf dem RT-PCR-Verfahren basierende Clonierung.

Verfahren zur Clonierung von zunächst partiellen und in der Folge Vollängen-cDNAs für das jeweilige Invertaseinhibitorprotein aus einer cDNA-Bank

Ausgehend von den erhaltenen Peptidsequenzinformationen werden gemäß des genetischen Codes Primersequenzen abgeleitet. Für das optimale Primerdesign werden Standardalgorithmen benutzt. In einer anderen Ausführung werden Primer an Hand hochkonservierter Sequenzbereiche der bereits bekannten In-

vertaseinhibitorsequenzen aus *Nicotiana tabacum*, *Lycopersicon esculentum*, *Arabidopsis thaliana* und *Citrus inshui* entworfen.

Zunächst wird eine 1.Strang cDNA-Synthese nach Standardverfahren durchgeführt. Hierfür wird Gesamt-RNA aus einer Zellsuspensionskultur, bzw. in einer anderen Ausführung aus Blüten mit jungen Samenanlagen nach Standardverfahren extrahiert. Über RT-PCR wird dann zunächst eine partielle Invertaseinhibitor-cDNA amplifiziert. Das Amplifikat wird in einer Ausführung in den Blueskript-Vektor cloniert. Nach Sequenzierung und Bestätigung einer zu den bereits bekannten Invertaseinhibitoren homologen Sequenz wird diese partielle cDNA als Sonde für die Gewinnung von Vollängenclonen eingesetzt. Hierfür wird nach Standardverfahren entweder eine cDNA-Bank aus einer Zellsuspensionskultur, oder in einer anderen Ausführung, eine cDNA-Bank aus Blüten mit jungen Samenanlagen angelegt.

Clonierung der Invertaseinhibitor cDNA in sense- bzw. antisense-Orientierung in einen Vektor, z.B. einen binären Vektor

Die für jede Pflanzenart clonierte Invertaseinhibitor-cDNA wird in einer Ausführungsform in den binären Vektor BinAR (Bin19 Derivat) (Höfgen und Willmitzer, Plant Sci. 66 (1990), 221-230) cloniert. Sowohl für antisense- wie auch für sense-Konstrukte wird in einer Ausführungsform der CaMV35S-Promotor verwendet, doch können gegebenenfalls auch andere, z.B. gewebespezifische Promotoren verwendet werden.

Figur 2 zeigt den binären Vektor (BinAR) zur Agrobakterium tumefaciens-vermittelten Transformation. Die codierenden Regionen der Invertaseinhibitor-cDNAs werden in sense- oder antisense-Orientierung in die 'multiple cloning site' cloniert.

Transformation der jeweiligen Pflanzenspezies mit den sense- bzw. antisense-Genkonstrukten

Für die meisten dicotylen Nutzpflanzen werden Invertaseinhibitor-sense/antisense-Transformanten unter Einsatz der Agrobakterium tumefaciens-vermittelten Transformation (Standardverfahren) gewonnen. Es wird demgemäß ein Agrobakterium eingesetzt, da es rekombinierte DNA-Moleküle enthält, die Invertaseinhibitor-cDNA in antisense oder sense-Orientierung aufweisen, d.h. in denen die Invertaseinhibitor cDNA 3'-wärts von einem Promotor und funktionell mit diesem verbunden vorliegt. Hierbei werden in einer für viele Pflanzenarten einsetzbaren Ausführungsform Blattstücke transformiert, wobei aus den rekombinanten Zellen auf Antibiotikumhaltigen Medium Primärtransformanten regeneriert werden. Die tatsächlich gewählte Transformationstechnik ist abhängig von der Pflanzenart. Durch Regeneration einer transformierten Pflanzenzelle wird eine transgene Pflanze erhalten.

Der Einfluß der veränderten Expression eines apoplastischen Invertaseinhibitors in *Nicotiana tabacum* wird im folgenden beschrieben:

Tabak (*Nicotiana tabacum*) wurde mit der cDNA des apoplastischen Tabak-Invertaseinhibitors (Clon Nt-

inh1; Greiner et al., a.a.O. 1998) in sense- und antisense-Orientierung transformiert (Agrobakterium tumefaciens-vermittelte Transformation, BinAR-Vektor, CaMV35S-Promotor; Blattscheiben-Transformation gemäß Standardverfahren). Die verwendete cDNA wurde aus einer Zellsuspensionskultur von Tabak gewonnen. Primärtransformanten wurden zunächst über Gewebekultur zu Pflanzen regeneriert und anschließend im Gewächshaus zur Blüte gebracht. Die Samen der Primärtransformanten wurden auf Kanamycin-haltigem Medium ausgesät. Nach steriler Voran- zucht wurden die Pflanzen der F1-Generation im Ge- wächshaus zur Blüte gebracht. Nach Bestäubung wur- den in regelmäßigen Zeitabständen die Zellwand- Invertase-Aktivitäten in den Ovarien bestimmt.

Die Figur 3 zeigt Zellwand-Invertase-Aktivitäten im Ovar von Tabak-Wildtyp (SNN), einer repräsentativen Inhibitor-antisense-Transformante (as16) und einer repäsentativen Inhibitor-sense-Transformante (s9) im Verlauf der frühen Samenentwicklung (0-14 Tage nach Befruchtung). Die Aktivitäten sind in mmol Glucose/g Frischgewicht/min angegeben.

Die Menge an Invertaseinhibitor-Protein wurde über Western Blot-Analyse ermittelt.

Figur 4 zeigt diesbezüglich den Nachweis der selek- tiven Reduktion (antisense-Transformante) bzw. Zu- nahme (sense-Transformante) des Invertaseinhibitor- Polypeptids in Stamina und Ovar, nachgewiesen mit einem gegen den rekombinanten Tabak- Invertaseinhibitor gerichteten Antiserum. (Sense- Transformante (s9): 1, Ovar; 2, Stamina. Antisense-

Transformante: 3, Ovar; 4, Stamina. Wildtyp (SNN): 5, Ovar; 6, Stamina). Es wurden über Concanavalin A-Chromatographie gereinigte Proben aufgetragen, in denen nur an Zellwand-Invertase gebundener Inhibitor enthalten ist.

Nach Reifung der Samen wurden deren Trockengewichte bestimmt, sowie die Menge an Speicheröl und Gesamtprotein.

Die Messung der Zellwand-Invertase-Aktivitäten während der frühen Samenentwicklung (Fig.3) zeigt zunächst für den Wildtyp eine ca. 6-fache Steigerung zwischen dem 6. und 12. Tag nach Bestäubung. Dieser Zeitraum entspricht der späten Zellteilungsphase und dem Beginn der Speicherphase. Die Western Blot-Analyse zeigt, daß im Ovar die Menge an Invertaseinhibitor-Polypeptid in antisense-Transformanten stark vermindert, in sense-Transformanten hingegen stark erhöht ist (Fig.4). Im Unterschied hierzu wirkt sich die veränderte Inhibitorexpression in Stamina nur geringfügig aus, vermutlich weil in diesem Gewebe mehrere Inhibitor-Isoformen exprimiert werden.

Die veränderte Aktivität der Zellwand-Invertase während der Samenentwicklung wirkt sich aus auf das Trockengewicht/Samen (Tab.1), den Gehalt an Speicheröl/Samen (Tab.2) und den Gesamtproteingehalt/Samen (Tab.3), nicht jedoch auf die Gesamtzahl an Samen pro Blüte und auch nicht auf die Samengröße.

Tab.1

Trockengewichte pro Samen in Tabak-Wildtyp (SNN), in zwei repräsentativen Inhibitor-sense-Transformanten (s9, s10) und in zwei repräsentativen Inhibitor-antisense-Transformanten (as16, as43).

Tabak-Linie	μg Trockengewicht/Samen	Prozent vom Wildtyp (SNN)
WT (SNN)	64 \pm 2	100
s9	42 \pm 2	66
s10	52 \pm 2	81
as16	71 \pm 1	110
as43	86 \pm 4	134

Tab.2

Samenöl-Gehalte pro Samen in Tabak-Wildtyp (SNN), in zwei repräsentativen Inhibitor-sense-Transformanten (s9, s10) und in zwei repräsentativen Inhibitor-antisense-Transformanten (as16, as43).

Tabak-Linie	μg Gesamtöl/Samen	Prozent vom Wildtyp (SNN)
WT (SNN)	23	100
s9	10	43
s10	16	69
as16	28	122
as43	39	170

Tab.3

Gesamtprotein pro Samen in Tabak-Wildtyp (SNN), in zwei repräsentativen Inhibitor-sense-Transformanten (s9, s10) und in zwei repräsentativen Inhibitor-antisense-Transformanten (as16, as43).

Tabak-Linie	µg Gesamtprotein/Samen	Prozent vom Wildtyp (SNN)
WT (SNN)	7.4	100
s9	5.5	74
s10	5.7	77
as16	7.8	105
as43	9.9	134

Die starke Erhöhung des Speicherölgehaltes in zwei unabhängigen antisense-Transformanten (+22% bzw. +70%) korreliert mit Zunahmen an Gesamtprotein und Samengewicht, wobei die Zunahme für Speicheröl am stärksten ausgeprägt ist. Bemerkenswerterweise korreliert die Zunahme der Zellwand-Invertase-Aktivität im Ovar während der Samenentwicklung mit der Phase der maximalen Akkumulation von Speicheröl.

Die gesamte vegetative Entwicklungsphase der Inhibitor-antisense- und Inhibitor-sense-Transformanten verläuft ohne sichtbaren Phänotyp, mit Ausnahme des Keimungsvorganges. Hier zeigt sich zwischen der Keimung von Tabak-Wildtyp-Samen und Invertaseinhibitor-antisense-Samen kein Unterschied, wohingegen es bei Samen von Invertaseinhibitor-sense-Trans-

formanten zu einer signifikanten Verzögerung der Keimung kommt.

Figur 5 zeigt das Keimungsverhalten von Samen des Tabak-Wildtyps (SNN), von Invertaseinhibitor-antisense-Transformanten (INHas) und von Invertaseinhibitor-sense-Transformanten. Pro Linie wurden unter sterilen Bedingungen jeweils 40 Samen auf LS-Medium (0.5% Saccharose, pH 5.6) ausgesät. Das Hervortreten der Radicula diente als Kriterium für die Keimung.

Ein weiteres Anwendungsbeispiel der vorliegenden Erfindung ist die Einführung eines Invertaseinhibitor-antisense-Konstruktes in Raps (*Brassica napus*). Raps enthält auf Samenbasis eine dem Tabak vergleichbare Menge an Speicheröl. Das Ergebnis einer Invertaseinhibitor-antisense-Transformation ist eine Erhöhung des Speicherölgehaltes um mindestens 20% , ggf. aber um bis zu 70%.

Eine weitere Anwendung mit dem gleichen Ziel, nämlich der Erhöhung des Speicheröl-Gehaltes, ist die Transformation der Sonnenblume, oder auch die Transformation der Sojabohne, mit einem Invertaseinhibitor-antisense-Konstrukt (Bereitstellung transgener Ölspeichernder Pflanzen dieser Spezies).

In einer weiteren Ausführungsform wird durch die Einbringung von Invertaseinhibitor-antisense-Konstrukten in Mais, Reis, Weizen, Hafer, Gerste und Roggen die Menge an Samen-Speicherstärke erhöht. Es können also transgene Pflanzenzellen oder Pflanzen, die Stärke speichern, bereitgestellt wer-

den. Für proteinreiche Samen, z.B. Sojabohne und Erbse, wird in einer weiteren Ausführungsform durch Einführung von Invertaseinhibitor-antisense-Konstrukten die Gesamtmenge an Speicherprotein erhöht.

In einer weiteren Ausführungsform wird durch die Einführung von Invertaseinhibitor-antisense-Konstrukten bzw. durch die daraus resultierende verbesserte Speicherstoffakkumulation die Keimfähigkeit von Samen einer Nutzpflanze erhöht.

Die Bereitstellung transgener Pflanzenzellen oder Pflanzen betrifft vorzugsweise Nutzpflanzen.

Ansprüche:

1. Transgene Pflanzenzelle bei der im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzenzellen aufgrund verminderter Expression von Invertaseinhibitoren eine erhöhte Aktivität der Zellwand-Invertase vorliegt, wobei diese verminderte Expression durch Einführung einer der gleichen Pflanzenart entsprechenden (homologen) und unter Regulation eines Promotors stehenden Invertaseinhibitor-cDNA in antisense-Orientierung ausgelöst wird.
2. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 1, wobei die erhöhte Aktivität der Zellwand-Invertase eine Steigerung des Assimilattransfers zwischen maternalem und Samengewebe bewirkt.
3. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Invertaseinhibitor-cDNA eine apoplastische Variante des Invertaseinhibitors codiert.
4. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Promotor ein CaMV35S-Promoter oder ein gewebespezifischer Promotor vergleichbarer oder höherer Aktivität ist.
5. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, die eine Zelle einer Nutzpflanze ist.

6. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 5, die eine Zelle einer ölspeichernden Pflanze ist.
7. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 5 oder 6, die eine Zelle von Raps, Sojabohne, Sonnenblume, Ölpalme, *Calendula officinalis*, *Coriandrum sativum*, *Crambe absyssinica*, *Cuphea* ssp., *Dimorphotheca pluvialis*, *Euphorbia lagascae*, *Euphorbia lathyris*, *Lesquerella grandiflora*, *Limnantes alba*, *Linum usitatissimum*, *Lunaria annua*, *Lunaria biennis*, *Oenothera* ssp., *Ricinus communis* oder *Simmondsia chinensis* ist.
8. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 5, die eine Zelle einer stärkespeichernden Pflanze ist.
9. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 5 oder 8, die eine Zelle von Reis, Mais, Roggen, Weizen, Hafer oder Gerste ist.
10. Transgene Pflanze, die durch Regeneration einer Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 9 gewonnen werden kann.
11. Transgene Pflanze nach Anspruch 10, die gegenüber der entsprechenden nicht transformierten Pflanze während der Samenentwicklung mehr Speicheröl, Speicherstärke oder Speicherprotein bildet.

12. Verfahren zur Gewinnung von in einem Vektor enthaltenden Invertaseinhibitor-cDNA-Sequenzen in sense-oder antisense-Orientierung, umfassend folgende Schritte:

- a) Gewinnung einer Inhibitorproteinfraktion aus der Zellwandprotein-Fraktion einer Zellsuspensionskultur oder von Blüten mit jungen Samenanlagen,
- b) Gewinnung von entsprechenden Peptidsequenzen nach Spaltung und Reinigung der entstandenen Peptide,
- c) Clonierung von zunächst partieller und in der Folge Vollängen-cDNA für das Invertaseinhibitorprotein aus einer cDNA-Bank, insbesondere aus einer Zellsuspensionskultur oder von Blüten mit jungen Samenanlagen und
- d) Clonierung der Invertaseinhibitor-cDNA in sense- oder antisense-Orientierung in einen Vektor, insbesondere einen binären Vektor.

13. Verfahren zur Herstellung einer transgenen, eine deregulierte und die Samenentwicklung fördernde Invertaseaktivität aufweisenden Pflanze, wobei eine Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors aus einer cDNA-Bank einer Zellsuspensionskultur oder von Blüten mit jungen Samenanlagen einer Pflanze gewonnen wird, eine Pflanzenzelle einer Pflanze der gleichen Art

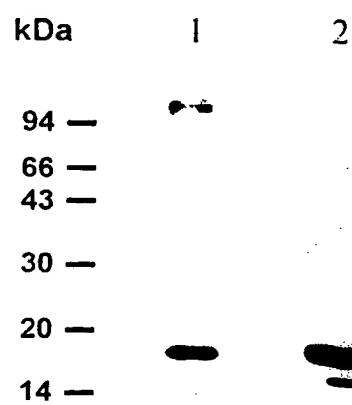
oder Sorte aus der die Nucleotidsequenz stammt oder abgeleitet ist mit einem DNA-Konstrukt, enthaltend die mit mindestens einer regulatorischen Einheit funktionell verbundene Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitorgens, transformiert, kultiviert und eine Pflanze regeneriert wird, deren Samen eine gegenüber nicht transformierten Wildtyppflanzen erhöhte Speicherstoffmenge aufweisen.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die regulatorische Einheit ein Promotor ist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der Promotor ein konstitutiver oder induzierbarer Promotor ist.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei der Promotor der 35SCaMV Promotor oder der Ubiquitin- oder Zein-Promotor aus Mais ist.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, wobei die Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitorgens eine cDNA, eine damit hybridisierende Nucleotidsequenz oder ein Fragment, einer der beiden ist.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 17, wobei der Invertaseinhibitor ein apoplastischer Invertaseinhibitor ist.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 18, wobei die Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitorgens sense- oder antisense-Orientierung zu dem Promotor aufweist.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 19, wobei das DNA-Konstrukt weitere regulatorische Einheiten, insbesondere ein Transcriptionsterminationssignal, aufweist.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 20, wobei das Transcriptionsterminationssignal aus dem NOS-Gen von *Agrobacterium tumefaciens* stammt.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 21, wobei die Pflanzenzelle eine Zelle einer dicotylen oder monocotylen Pflanze ist.
23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die Pflanzenzelle eine Zelle von Raps, Sonnenblumen, Erdnuß, Sojabohne, Ölpalme, Reis, Mais, Weizen, Gerste, Hafer, Roggen, Erbse, *Calendula officinalis*, *Coriandrum sativum*, *Crambe abyssinica*, *Cuphea* ssp., *Dimorphotheca pluvialis*, *Euphorbia lagascae*, *Euphorbia lathyris*, *Lesquerella grandiflora*, *Limnanthes alba*, *Linum usitatissimum*, *Lunaria annua*, *Lunaria biennis*, *Oenothera* ssp., *Ricinus communis* oder *Simmondsia chinensis* ist.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 23, wobei das DNA-Konstrukt in einem Vektor, insbesondere einem Plasmid oder Virus, vorliegt.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 24, wobei die Transformation der Pflanzenzelle mittels *Agrobacterium tumefaciens*, biolistischer Verfahren, mittels elektrisch oder chemisch induzierter DNA Aufnahme, Elektroporation, Makroinjektion, Mikroinjektion oder PEG-vermittelter Transformation durchgeführt wird.
26. Transgene Pflanze, herstellbar nach einem der Verfahren der Ansprüche 13 bis 25 sowie ein Teil davon.
27. Vermehrungs- und Erntematerial einer Pflanze nach Anspruch 26.
28. Vermehrungs- und Erntematerial nach Anspruch 27, das Frucht, Samen, Samenschale, Embryo, Sämling, Kallus, Zellkultur, Stengel, Blatt oder Wurzel ist.
29. Verwendung einer funktionell mit mindestens einer regulatorischen Einheit verbundenen Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitorgens zur Transformation und Herstellung von transgenen Pflanzen, die als Folge der Transformation eine modifizierte Samenentwicklung aufweisen.
30. Verwendung nach Anspruch 29, wobei die modifizierte Samenentwicklung eine Samenentwicklung ist, gemäß der die Samen der transgenen Pflanze eine gegenüber Samen einer nicht transformierten Wildtyppflanze eine erhöhte Speicherstoffmenge aufweisen.

31. Verwendung nach einem der Ansprüche 29 oder 30 wobei die Nucleotidsequenz aus einer cDNA-Bank einer Zellsuspensionskultur oder aus Blüten mit jungen Samenanlagen der zu transformierenden Pflanzenart oder -sorte stammt oder davon abgeleitet ist.
32. Verwendung nach einem der Ansprüche 29 bis 31, wobei die Nucleotidsequenz in antisense-Orientierung zu der mindestens einen regulatorischen Einheit, insbesondere dem Promotor, vorliegt.



ERSATZBLATT (REGEL 26)

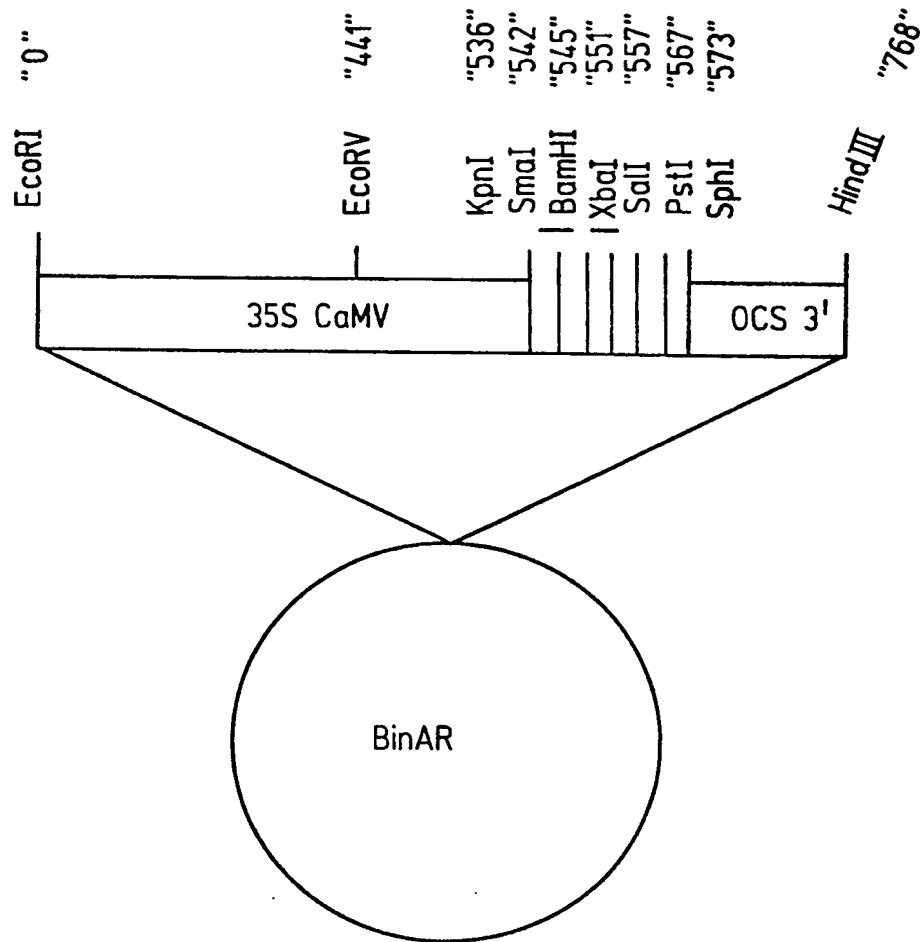


Fig.2

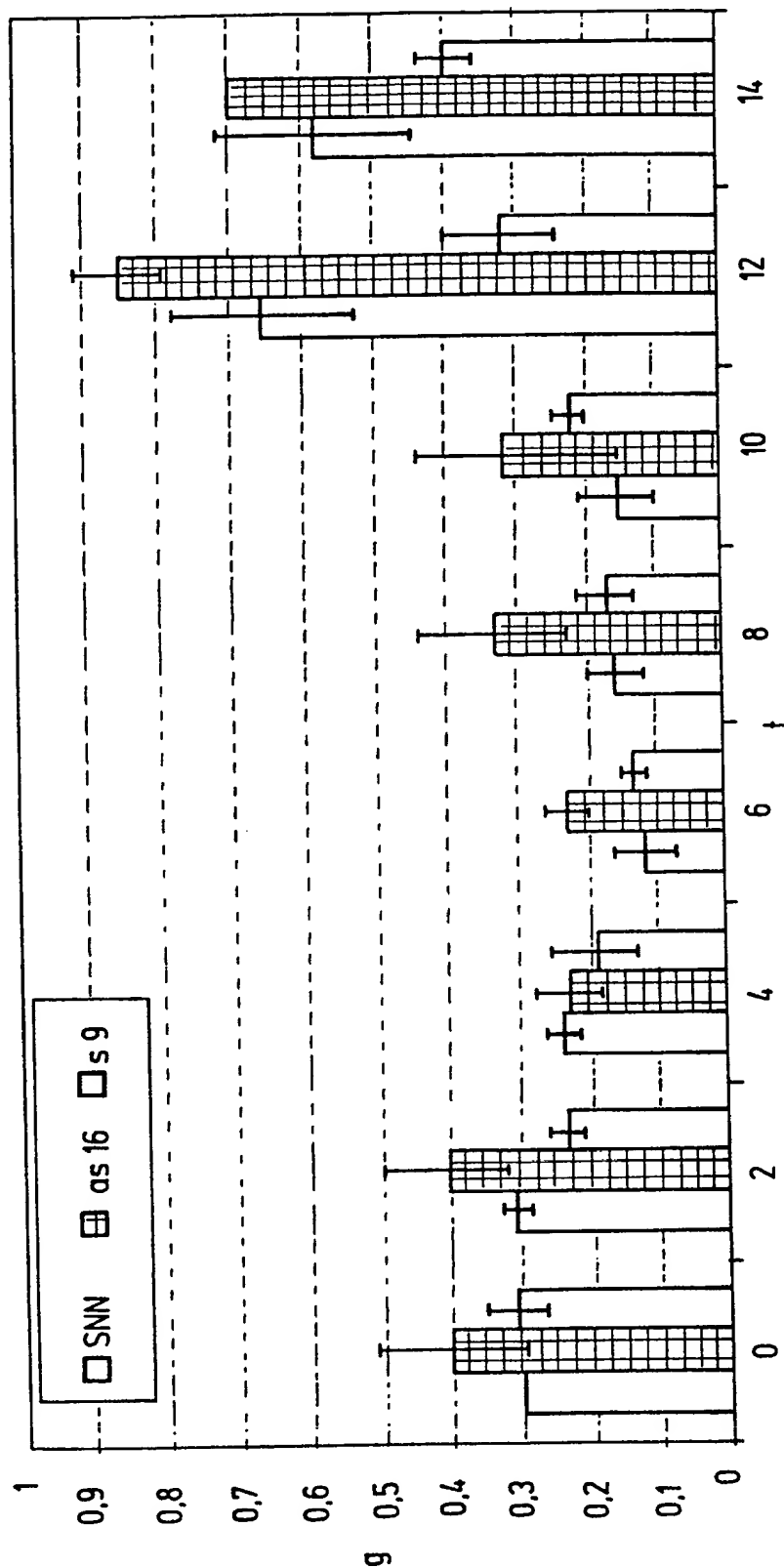


Fig.3

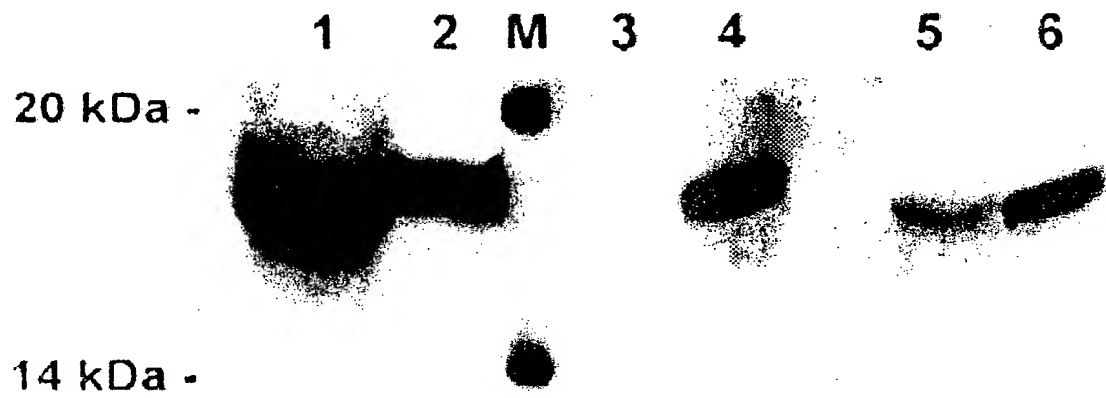


Fig. 4

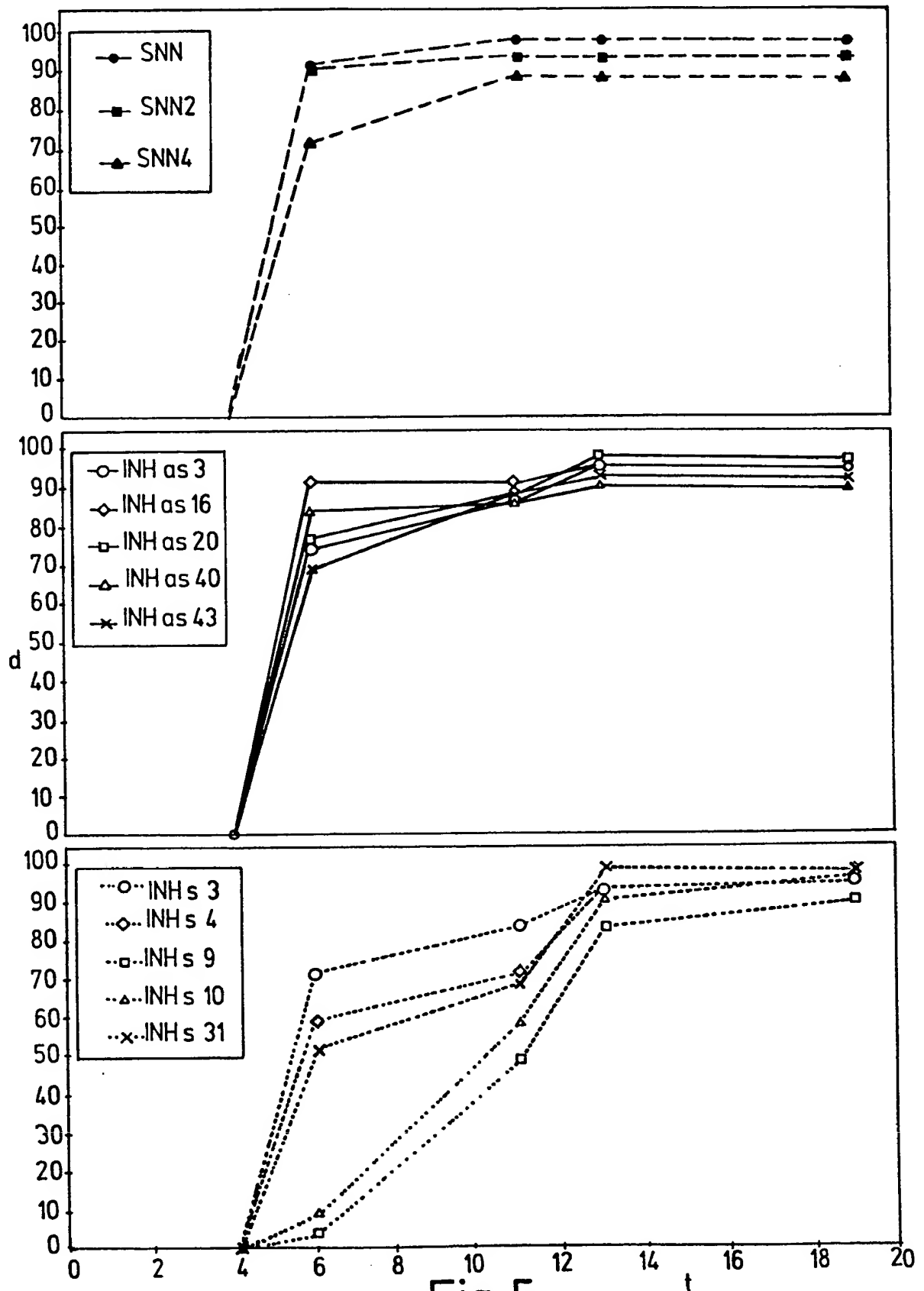


Fig. 5

ERSATZBLATT (REGEL 26)

PCT/EP 99/05890

IPC 7 C12N15/82 C07K14/415 C12N5/10 A01H5/00

B. FIELDS SEARCHED

IPC 7 C12N C07K A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GREINER, S., ET AL. : "cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 116, February 1998 (1998-02), pages 733-742, XP002125613 cited in the application the whole document	1-5, 11-22, 24-32
A	KRAUSGRILL, S., ET AL. : "In transformed tobacco cells the apoplasmic invertase inhibitor operates as a regulatory switch of cell wall invertase" THE PLANT JOURNAL, vol. 13, no. 2, January 1998 (1998-01), pages 275-280, XP002125614 the whole document	1-32

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

- Special categories of cited documents :

- "A"** document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E"** earlier document but published on or after the international filing date
- "I"** document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O"** document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P"** document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 December 1999

Date of mailing of the international search report

11/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer _____

Holtorf, S

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KRAUSGRILL S ET AL: "REGULATION OF CELL WALL INVERTASE BY A PROTEINACEOUS INHIBITOR" JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, vol. 47, page 1193-1198 XP002050469 ISSN: 0022-0957 page 1194, left column; page 1197	1-32
A	SANDER A ET AL: "SUCROSE PROTECTS CELL WALL INVERTASE BUT NOT VACUOLAR INVERTASE AGAINST PROTEINACEOUS INHIBITORS" FEBS LETTERS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 385, no. 3, page 171-175 XP002049864 ISSN: 0014-5793 the whole document	1-32
A	EP 0 442 592 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 21 August 1991 (1991-08-21) column 15 -column 18	1-32
A	WO 97 07221 A (RIESMEIER JOERG ; TRETHEWEY RICHARD (DE); WILLMITZER LOTHAR (DE)) 27 February 1997 (1997-02-27) page 5	1-32
A	WO 98 04722 A (RAUSCH THOMAS ; GREINER STEFFEN (DE); UNIV HEIDELBERG (DE); KRAUSGR) 5 February 1998 (1998-02-05) page 12, lines 3-9	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/05890

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0442592 A	21-08-1991	DE 4004800 A	14-08-1991
		AU 650639 B	30-06-1994
		AU 7089891 A	15-08-1991
		CA 2036103 A	14-08-1991
		JP 5049482 A	02-03-1993
		US 5436394 A	25-07-1995
		US 5917127 A	29-06-1999
WO 9707221 A	27-02-1997	DE 19529696 A	13-02-1997
		AU 6820496 A	12-03-1997
		CA 2229061 A	27-02-1997
		CN 1196090 A	14-10-1998
		EP 0846180 A	10-06-1998
WO 9804722 A	05-02-1998	DE 19630738 A	05-02-1998
		EP 0956357 A	17-11-1999

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/82 C07K14/415 C12N5/10 A01H5/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N C07K A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GREINER, S., ET AL. : "cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor" PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 116, Februar 1998 (1998-02), Seiten 733-742, XP002125613 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-5, 11-22, 24-32
A	KRAUSGRILL, S., ET AL. : "in transformed tobacco cells the apoplasmic invertase inhibitor operates as a regulatory switch of cell wall invertase" THE PLANT JOURNAL, Bd. 13, Nr. 2, Januar 1998 (1998-01), Seiten 275-280, XP002125614 das ganze Dokument	1-32

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"a" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abchlusses der internationalen Recherche

17. Dezember 1999

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

11/01/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	KRAUSGRILL S ET AL: "REGULATION OF CELL WALL INVERTASE BY A PROTEINACEOUS INHIBITOR" JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, Bd. 47, Seite 1193-1198 XP002050469 ISSN: 0022-0957 Seite 1194, linke Spalte; Seite 1197	1-32
A	SANDER A ET AL: "SUCROSE PROTECTS CELL WALL INVERTASE BUT NOT VACUOLAR INVERTASE AGAINST PROTEINACEOUS INHIBITORS" FEBS LETTERS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 385, Nr. 3, Seite 171-175 XP002049864 ISSN: 0014-5793 das ganze Dokument	1-32
A	EP 0 442 592 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 21. August 1991 (1991-08-21) Spalte 15 -Spalte 18	1-32
A	WO 97 07221 A (RIESMEIER JOERG ; TRETHEWEY RICHARD (DE); WILLMITZER LOTHAR (DE)) 27. Februar 1997 (1997-02-27) Seite 5	1-32
A	WO 98 04722 A (RAUSCH THOMAS ; GREINER STEFFEN (DE); UNIV HEIDELBERG (DE); KRAUSGR) 5. Februar 1998 (1998-02-05) Seite 12, Zeile 3-9	1-32

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

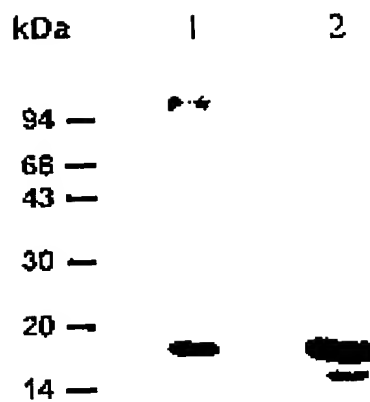
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationaler Aktenzeichen

PCT/EP 99/05890

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0442592 A	21-08-1991	DE 4004800 A	14-08-1991
		AU 650639 B	30-06-1994
		AU 7089891 A	15-08-1991
		CA 2036103 A	14-08-1991
		JP 5049482 A	02-03-1993
		US 5436394 A	25-07-1995
		US 5917127 A	29-06-1999
WO 9707221 A	27-02-1997	DE 19529696 A	13-02-1997
		AU 6820496 A	12-03-1997
		CA 2229061 A	27-02-1997
		CN 1196090 A	14-10-1998
		EP 0846180 A	10-06-1998
WO 9804722 A	05-02-1998	DE 19630738 A	05-02-1998
		EP 0956357 A	17-11-1999

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie) (Juli 1992)



ERSATZBLATT (REGEL 26)

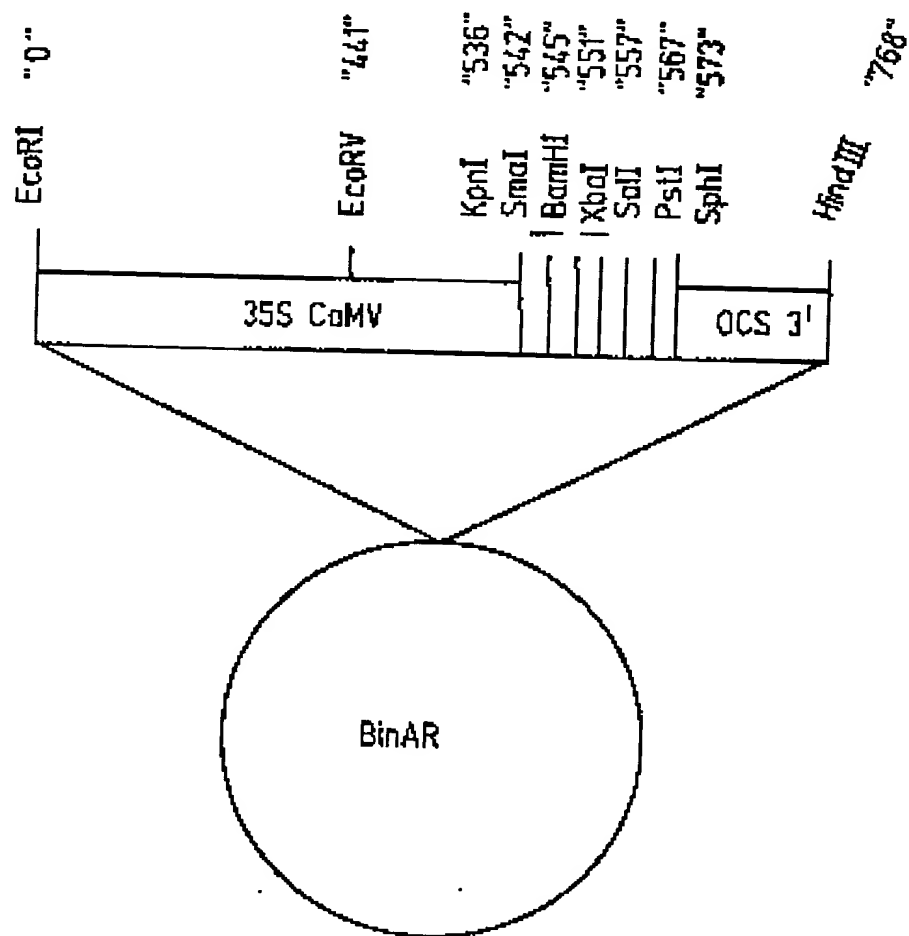


Fig.2

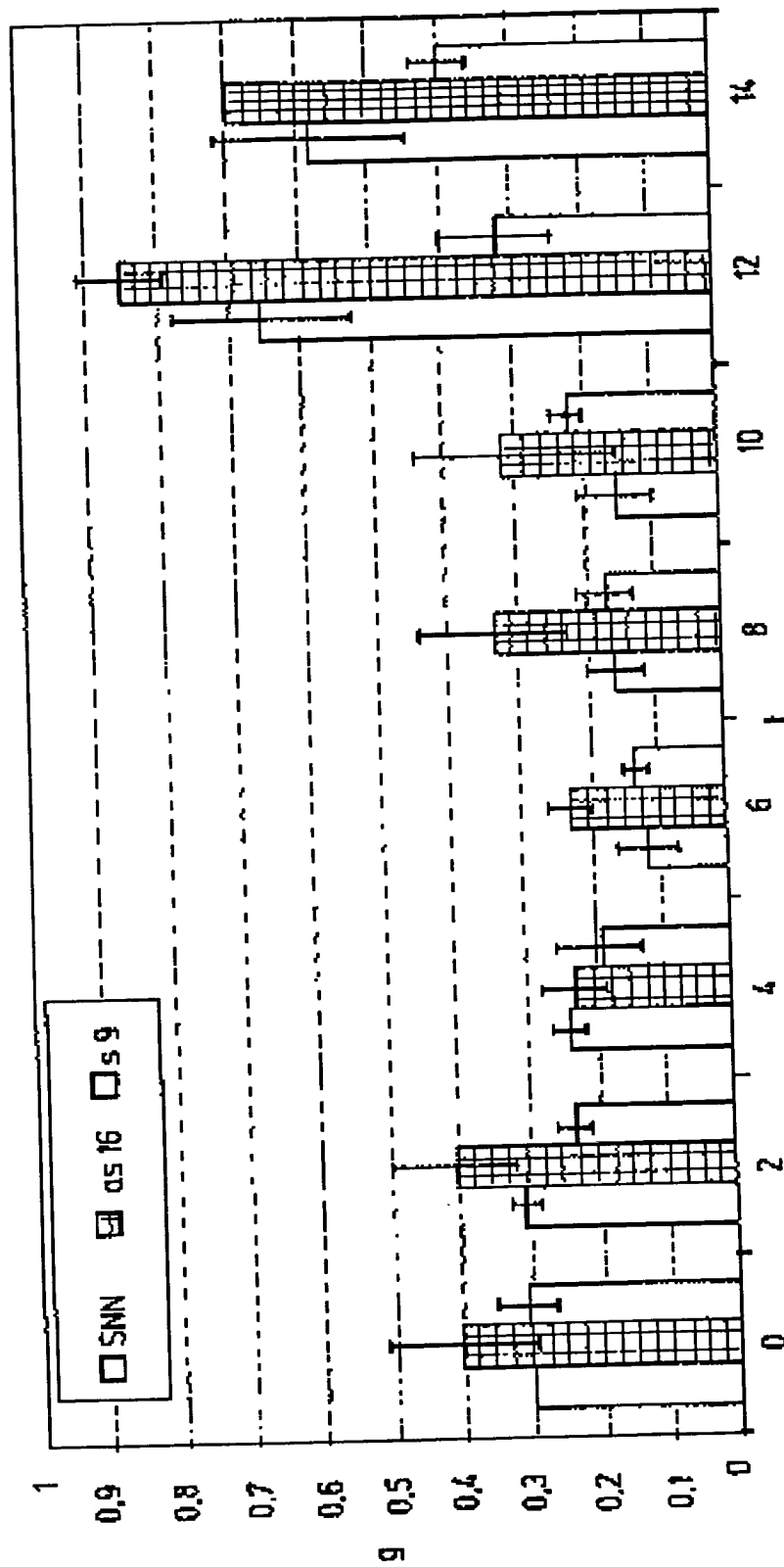


Fig.3

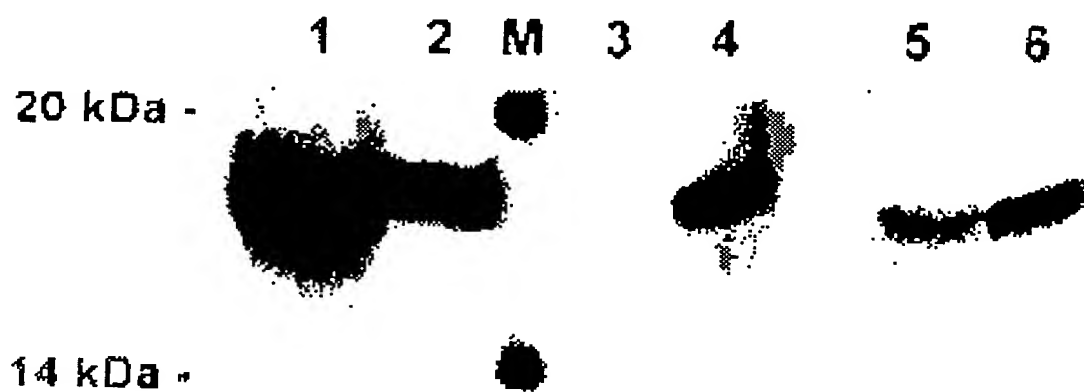


FIG. 4

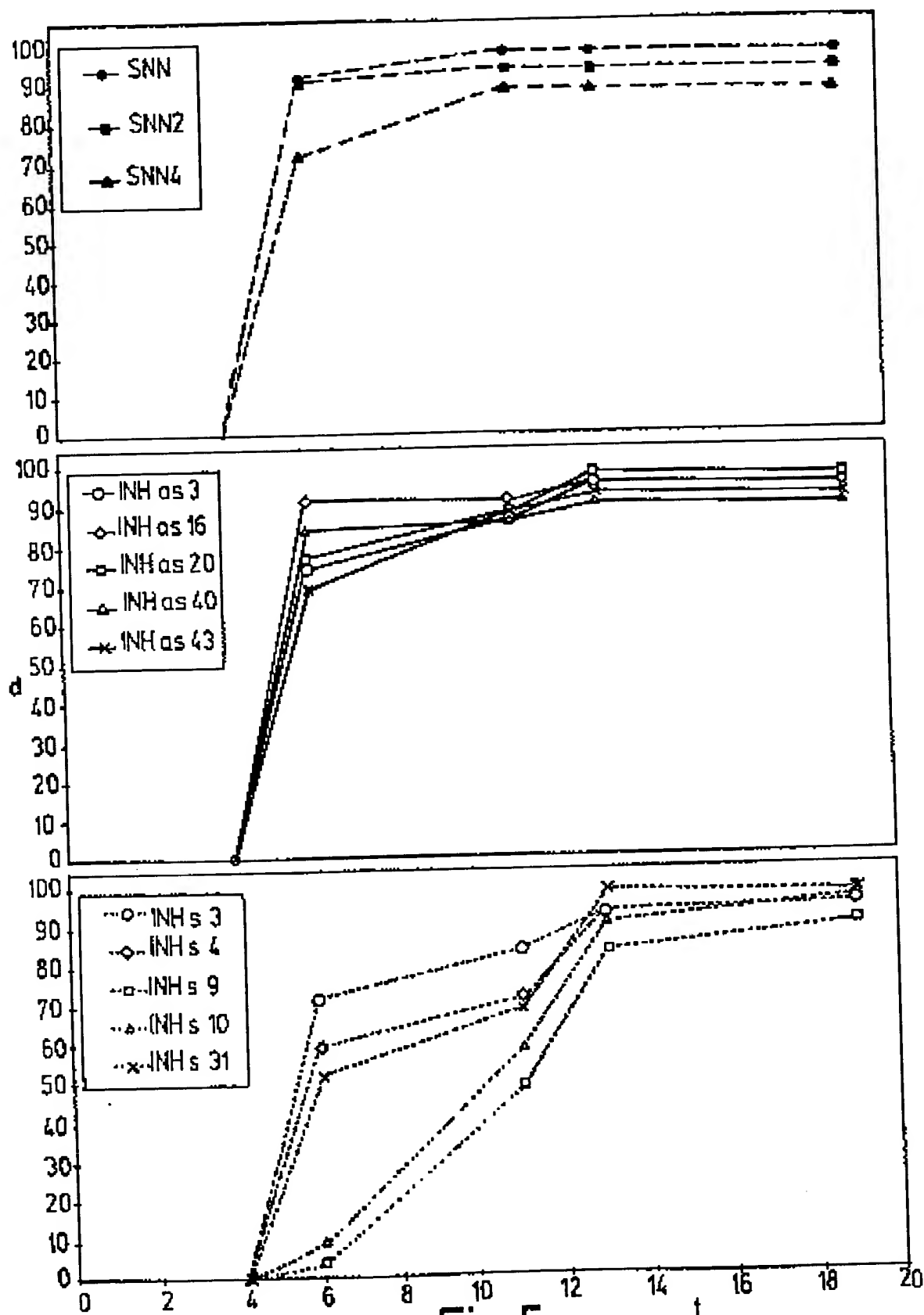


Fig. 5

ERSATZBLATT (REGEL 26)

